

УДК 616.716.8.02

ОПТИМИЗАЦИЯ РЕПАРАТИВНОГО ДЕНТИНОГЕНЕЗА ПУЛЬПЫ ЗУБА ПРИ ОСТЕОПОРОЗЕ

Кобылкина Т.Л.

ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет», Ставрополь, Россия (355000, Ставрополь, ул. Мира, 310), e-mail: postmaster@stgma.ru, <http://www.stgma.ru>

В статье представлен анализ гистохимических изменений пульпы зубов овец при биологических методах лечения пульпита в условиях экспериментального остеопороза. В качестве покрытия корневой пульпы использовали тканеинженерную конструкцию, в состав которой входил гидрогель PuraMatrix/3DM с эктомезенхимальными клетками, иммобилизованными на коллагеновую губку. В ходе проведенного экспериментального исследования было установлено, что разработанная тканеинженерная конструкция оказывает оптимизирующее саногенетическое действие на каждом этапе процесса заживления и регенерации: защищает пульпу от инфицирования, уменьшает экссудацию, оказывает гемостатический эффект, а в отдаленные сроки способствует значительному ускорению образования дентинного мостика, что имеет важное научно-практическое значение. Анализ активности C-kit - трансмембранного рецептора белка тирозина свидетельствует об участии в описанных эффектах клеточного состава предложенной конструкции.

Ключевые слова: остеопороз, эксперимент, биологический метод лечения, тканеинженерная конструкция

OPTIMIZATION OF REPARATIVE DENTINOGENESIS OF THE TOOTH PULP IN CASES OF OSTEOPOROSIS

Kobylkina T.L.

GBOU VPO "Stavropol State Medical University", Stavropol, Russia (355000, Stavropol, Mira str., 310), e-mail: postmaster@stgma.ru, <http://www.stgma.ru>

The article presents the analysis of histochemical changes of the pulp of teeth sheep at biological methods of treatment of pulpitis in terms of experimental osteoporosis. As coverage of the root pulp used tissue-engineered structure composed of a hydrogel PuraMatrix/3DM with ectomesenchyme cells immobilized on collagen sponge. During the experimental study, it was found that the developed tissue-engineered design provides an optimizing sanogenetic action at each stage of the healing process and regeneration: protecting the pulp from infection, reduces exudation, has a hemostatic effect and in long term contributes to a significant acceleration of the formation of the dentinal bridge, which has important practical and scientific value. Activity analysis of C-kit transmembrane receptor protein tyrosine indicates the involvement in the described effects of cellular composition of the proposed design

Keywords: osteoporosis, experiment, biological method of treatment, tissue-engineered design

Введение. Сохранение жизнеспособной пульпы или только корневой ее части при оперативных вмешательствах обеспечивает нормальную трофику тканей зуба и предупреждает развитие периапикальных осложнений [4,16,28]. Среди наиболее опасных осложнений воспаления пульпы зуба такие заболевания, как периодонтит, периостит, остеонекроз, флегмона [1,19,22]. В нашей стране и за рубежом постоянно ведутся поиски наиболее эффективных средств, сохраняющих корневую пульпу и стимулирующих репаративный дентиногенез [7,8,25,27].

Для покрытия корневой пульпы некоторые авторы предлагают препараты, содержащие коллаген, мукополисахариды, антибиотики, антисептики, анестетики, гормоны [6,10,14,21]. Перспективным также является использование коллагеновой губки в качестве матрицы-носителя для различных тканеинженерных конструкций [20,23,27]. Особое значение приобретают в этой связи эктомезенхимальные стволовые клетки, дающие начало одонтобластам пульпы зуба [2,9,13,22]. В настоящее время в основе идентификации данных клеток организма лежит оценка их морфологии и поверхностных маркеров [11,12,24]. Одним из наиболее перспективных маркеров стволовых клеток является C-kit (CD117), который является рецептором к фактору стволовых прогенеторных клеток StemCellsFactor – SCF, что характеризует его как рецептор, маркирующий «взрослые» или «способные к дифференциации» стволовые клетки [3,5,15]. В научных публикациях встречаются данные об обнаружении C-kit-позитивных клеток у человека в сердце, желудке и кишечнике, мочеточниках, а также единичные сведения об их идентификации в почках, поджелудочной железе и пульпе зуба [17,18,26]. В современной стоматологии, представляется важным изучение аспектов сохранения и стимуляции саногенетических свойств пульпы зубов в условиях экспериментального остеопороза, что и стало целью настоящего исследования.

Цель исследования. Гистохимическое исследование роли C-kit-позитивных клеток пульпы зуба в оптимизации репаративного дентиногенеза при биологических методах лечения пульпита в условиях экспериментального остеопороза.

Материал и методы исследования. Для покрытия корневой пульпы при биологическом методе лечения пульпита использовали тканеинженерную конструкцию, в состав которой входит гидрогель PuraMatrix/3DM с эктомезенхимальными клетками, иммобилизованными на коллагеновую губку. Данная тканеинженерная конструкция представляет собой синтетический биodeградируемый матрикс-гель на основе олигопептидных фрагментов, формирующий нанонити и предварительно культивированные эктомезенхимальные клетки барана, обработанные 5-азациитидином. Выбор губки в качестве матрицы-носителя тканеинженерной конструкции обусловлен тем, что, меняя параметры исходного раствора и режима лиофилизации, можно варьировать структуру губки, изменяя тем самым ее механическую прочность, эластичность, адсорбционную емкость, скорость ангио- и неогенеза в зависимости от цели применения.

Экспериментальное исследование проведено на 12 двухлетних овцах Северо-Кавказской породы. Все животные разделены на 2 группы: основную (8 животных) и контрольную (4 животных). В основной группе формировали экспериментальную модель остеопороза: под общим наркозом (Zoletil100) выполняли овариоэктомию, затем в течение 3 месяцев проводили внутримышечные инъекции дексаметазона (10 мг/кг массы по 4

инъекции в неделю). Забор материала производили в области нижних резцов (зацепов), путем выделения зубоальвеолярных сегментов под общим наркозом через 1, 7, 14, 30, 60 и 180 суток после начала опыта. В контрольной группе исследовали соответствующие зубоальвеолярные сегменты у интактных животных.

Для получения экспериментальной модели острого пульпита применяли следующую методику. С язычной поверхности бором формировали полости по типу глубокого кариеса и инфицировали различными штаммами микроорганизмов, выделенных из кариозных зубов человека, после чего зубы пломбировались. Как показали гистологические исследования, такая методика вызывала серозно-гнойное воспаление коронковой пульпы. Через 1 сутки под местной анестезией sol.Ultracaini4% с адреналином 1:200000 в асептических условиях производили витальную ампутацию пульпы. Гемостаз пульпы осуществляли стерильными ватными шариками. В основной группе животных на дно полости зуба в области устья корневого канала накладывали тканеинженерную конструкцию, состоящую из коллагеновой губки, гидрогеля PuraMatrix/3DM и прекультивированных эктомезенхимальных клеток с последующим пломбированием зуба. В контрольной группе в состав коллагеновых губок вводили гидрокортизон, фурацилин, хондроитинсульфат, анестезин (всего 8 различных прописей). Зубы удаляли в сроки от 1 суток до 6 месяцев. Материал, взятый для гистологических исследований (n=96), фиксировали в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина, проводили через спирты возрастающей плотности и ксилол, а затем заливали в гистологическую среду «Гистомикс» с использованием гистологического процессора замкнутого типа Tissue-Tek VIP™ 5 Jr. производства Sakura (Япония).

Для обзорных целей гистосрезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизон и Массону согласно рекомендациям, изложенным в руководстве В.В. Семченко (2006). Идентификацию введенных в состав тканеинженерной конструкции прекультивированных клеток и собственных клеток пульпы проводили с использованием гистохимических методов оценки, включая анализ активности C-kit - трансмембранного рецептора белка тирозина, который кодируется доминантной аллелью (насыщенным окрасом, white-spotting или ген W).

Эксперимент на животных проводили в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт «Принципы надлежащей лабораторной практики» ГОСТ Р 53434-2009) и положительным заключением этического комитета ГБОУ ВПО СтГМУ Минздрава России №32 от 12.02.2015.

Результаты и обсуждение. Используя коллаген в комбинации с другими препаратами при витальной ампутации пульпы зуба в эксперименте, мы исходили из принципов патогенетической терапии ран: закрытие раневой поверхности от вторичной инфекции;

ускорение дентиногенеза за счет стимуляции его образования на поверхности тканеинженерной конструкции из коллагена с прекультивированными эктомезенхимальными клетками и гидрогелем PuraMatrix/3DM; стимуляции заживления раны и отложения солей кальция путем комплексообразования с хондроитинсульфатом, являющимся естественным активатором фибриллогенеза и связывающим ионы кальция; ускорение регенерации действием продуктов лизиса. Предполагалось, что коллаген в составе тканеинженерной конструкции может стать основной для образования новой ткани и, рассасываясь, постепенно будет замещаться дентином, образуя, таким образом, дентинный мостик, прикрывающий вход в корневые каналы.

Установлено, что в сроки 7-14 суток гистологические исследования пульпы зубов в контрольной группе показали явления вакуолизации одонтобластов, гиперемии пульпы, наличие внутрипульпарных кист, кровоизлияний в пульпе и слоеодонтобластов, серозный отек плащевого дентина и частичное его отторжение. На гистологических препаратах в основной группев эти же сроки после витальной ампутации и наложения коллагеновой губки с тканеинженерной конструкцией также выявлены воспалительные изменения, выражающиеся в незначительном полнокровии сосудов корневой пульпы, отеке, диапедезных кровоизлияниях. К 30 суткам эксперимента в контрольной группе серозно-фибринозная экссудация сменяется диффузной нейтрофильной, а затем лимфоидно-макрофагальной инфильтрацией. Резорбция инокулированной коллагеновой губки в основном осуществляется макрофагами, которые к данному сроку наблюдения местами формируют макрофагальный «барьер» между губкой и корневой пульпой с эктазией дентинных канальцев и некрозом отростков одонтобластов. В основной группе процессы регенерации пульпы протекают значительно быстрее, и к сроку 1 месяц развитие соединительной ткани на месте лизированной коллагеновой губки идет не только с периферии, но и из центра корневой пульпы. Гистохимическими методами установлено, что в резорбции тканеинженерной конструкции активно участвуют многоядерные гигантские клетки, появляющиеся позднее макрофагов вокруг нерезорбированных фрагментов коллагеновой матрицы.

Через 2 месяца после начала опыта в контрольной группе наблюдаются фрагменты новообразованного дентина, расположенные на периферии корневого канала, но не смыкающиеся в центре; описанная картина на некоторых препаратах имела вид «прерванного моста».

К данному сроку в основной группе во всех исследуемых препаратах отмечается четко сформированный дентинный мостик, по структуре схожий с дентином, отделяющий корневую пульпу от пульповой камеры. Новообразованный дентин с хорошо выраженными,

параллельно расположенными дентинными канальцами образуется от стенок корневого канала и, смыкаясь, формирует четкий барьер. Корневая пульпа полностью сохранена, отмечается полнокровие сосудов. Слой одонтобластов хорошо выражен, на препаратах при четко сформированном дентинном мостике в корневой пульпе отмечаются склеротические изменения и очаги лимфо-гистиоцитарной инфильтрации.

Гистохимические методы исследования показали, что оптимизация воспалительного процесса с активизацией пролиферации в основной группе были обеспечены клеточным составом использованной тканеинженерной конструкции. В основной группе животных произошла активизация клеток как эктомезенхимального, так и мезенхимального стволовых компартментов пульпы зуба: прекультивированные эктомезенхимальные клетки из тканеинженерной конструкции реализовали свое участие в процессе регенерации пульпы на каждом этапе межклеточного взаимодействия по регуляции большинства биологических процессов в клетке, таких, как пролиферация, дифференцировка, адгезия клеток и миграция. За счет реакции фосфорилирования тирозина тирозинкиназой обеспечивается связывание трансмембранного рецептора C-kit с лигандом SCF, что позволило оценить антиапоптотические события в прогениторных клетках на каждом из этапов репаративного дентиногенеза.

Таким образом, в контрольной группе при использовании коллагеновой губки в комбинации с различными препаратами, призванными стимулировать регенерацию корневой пульпы после витальной ампутации, образование дентинного мостика протекает значительно медленнее, чем в основной группе. Намечающийся дентинный мостик в контрольной группе мы наблюдали только к сроку 3-х месяцев, напротив, в основной группе репаративный дентиногенез завершился построением дентинного моста к сроку 2-х месяцев. В ряде случаев корневая пульпа под дентинным мостиком в контрольной группе вообще не регенерировала, и на большинстве препаратов наблюдались явления ее фиброзного превращения.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют, что в ранние сроки наблюдения от 1 до 7 суток в корневой пульпе после витальной ампутации коронковой пульпы у экспериментальных животных основной и контрольной групп развивается асептическое воспаление. В последующие сроки наблюдения в основной группе разработанная тканеинженерная конструкция оказывает наиболее выраженное влияние на каждом этапе процесса заживления и регенерации: защищает пульпу от инфицирования, уменьшает экссудацию, оказывает гемостатический эффект, а в отдаленные сроки способствует значительному ускорению образования дентинного мостика.

Список литературы

1. Будзинский Н.Э. Определение антимикробной активности мирамистина, иммобилизованного на композиционном полисорбе, на микрофлору корневых каналов при остром и обострившемся хроническом периодонтите и процесс остеофикации в эксперименте на животных / Будзинский Н.Э., Сирак С.В., Максимова Е.М., Сирак А.Г. // *Фундаментальные исследования*. 2013. № 7-3. С. 518-522.
2. Будзинский Н.Э. Особенности лечения хронического верхушечного периодонтита с использованием мирамистина, иммобилизованного на композиционном полисорбе / Будзинский Н.Э., Сирак С.В. // *Современные проблемы науки и образования*. 2013. № 3. С. 133.
3. Быков И.М. Апробация нового зубного эликсира для профилактики кариеса зубов в условиях эксперимента / Быков И.М., Сирак А.Г., Сирак С.В. // *Современные проблемы науки и образования*. 2013. № 4. С. 128.
4. Григорьянц Л.А. Некоторые особенности топографии нижнечелюстного канала / Григорьянц Л.А., Сирак С.В., Будзинский Н.Э. // *Клиническая стоматология*. 2006. № 1. С. 46-51.
5. Григорьян А.А. Разработка и клиническое применение нового ранозаживляющего средства для лечения заболеваний слизистой оболочки полости рта у детей и подростков / Григорьян А.А., Сирак С.В., Сирак А.Г., Ханова С.А. // *Современные проблемы науки и образования*. 2013. № 2. С. 41.
6. Сирак А.Г. Морфофункциональные изменения в пульпе зубов экспериментальных животных при лечении глубокого кариеса и острого очагового пульпита с использованием разработанных лекарственных композиций / Сирак А.Г., Сирак С.В. // *Современные проблемы науки и образования*. 2013. № 2. С. 44.
7. Сирак А.Г. Динамика репаративного дентиногенеза после лечения глубокого кариеса и острого очагового пульпита разработанной поликомпонентной лечебной пастой / Сирак А.Г., Сирак С.В. // *Фундаментальные исследования*. 2013. № 5-2. С. 384-388.
8. Сирак С.В. Изучение морфологических изменений в пульпе зубов экспериментальных животных при лечении глубокого кариеса и острого очагового пульпита / Сирак С.В., Сирак А.Г., Копылова И.А., Бирагова А.К. // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2011. Т. 23. № 3. С. 29-33.
9. Сирак С.В. Влияние пористого титана на остеогенный потенциал клеток костного мозга *in vitro* / Сирак С.В., Ибрагимов И.М., Кодзоков Б.А. // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2012. Т. 27. № 3. С. 22-25.

10. Сирак С.В. Профилактика кариеса и воспалительных заболеваний пародонта с использованием зубных эликсиров /Сирак С.В., Быков И.М., Сирак А.Г., Акопова Л.В.//Кубанский научный медицинский вестник. 2013. № 6 (141). С. 166-169.
11. Сирак С.В. Использование пористого титана для субантральной аугментации кости при дентальной имплантации (экспериментальное исследование) /Сирак С.В., Слетов А.А., Мартиросян А.К., Ибрагимов И.М., Перикова М.Г. //Медицинский вестник Северного Кавказа. 2013. Т. 8. № 3. С. 42-44.
12. Сирак С.В. Субантральная аугментация пористым титаном в эксперименте и клинике /Сирак С.В., Щетинин Е.В., Слетов А.А. //Стоматология. 2016. Т. 95. № 1. С. 55-58.
13. Сирак С.В. Способ субантральной аугментации кости для установки дентальных имплантатов при атрофии альвеолярного отростка верхней челюсти /Сирак С.В., Ибрагимов И.М., Кодзоков Б.А., Перикова М.Г. // Патент на изобретение RUS 2469675 09.11.2011
14. Сирак С.В. Клинико-экспериментальное обоснование применения препарата Коллост и биорезорбируемых мембран Диплен-гам и Пародонкол при удалении ретенированных и дистопированных нижних третьих моляров /Сирак С.В., Слетов А.А., Алимов А.Ш., Цховребов А.Ч., Федурченко А.В., Афанасьева О.В.//Стоматология. 2008. Т. 87. № 2. С. 10-14.
15. Сирак С.В. Клинико-экспериментальное использование остеопластических материалов в сочетании с электромагнитным излучением для ускорения регенерации костных дефектов челюстей /Сирак С.В., Казиева И.Э., Мартиросян А.К.//Фундаментальные исследования. 2013. № 5-2. С. 389-393.
16. Сирак С.В. Изучение особенностей анатомо-топографического строения нижней челюсти для планирования эндодонтического и имплантологического лечения /Сирак С.В., Долгалева А.А., Слетов А.А., Михайленко А.А.//Институт стоматологии. 2008. Т. 2. № 39. С. 84-87.
17. Сирак С.В. Оценка риска осложнений эндодонтических манипуляций на основе показателей анатомо-топографического строения нижней челюсти /Сирак С.В., Коробкеев А.А., Шаповалова И.А., Михайленко А.А.//Эндодонтия Today. 2008. № 2. С. 55-60.
18. Слетов А.А. Экспериментальное определение регенераторного потенциала клеток костного мозга /Слетов А.А., Переверзев Р.В., Ибрагимов И.М., Кодзоков Б.А., Сирак С.В.//Стоматология для всех. 2012. № 2. С. 29-31.
19. Grimm W.D. Prefabricated 3D allogenic bone block in conjunction with stem cell-containing subepithelial connective tissue graft for horizontal alveolar bone augmentation:a case report as proof of clinical study principles /Grimm W.D., Plöger M., Schau I., Vukovic M.A., Shchetinin E., Akkalaev A.B., Arutunov A.V., Sirak S.V.//Медицинский вестник Северного

Кавказа. 2014. Т. 9. № 2 (34). С. 175-178.

20. Grimm W.D. Clinical, radiographic, and histological analyses after transplantation of crest-related palatal-derived ectomesenchymal stem cells (paldscs) for improving vertical alveolar bone augmentation in critical size alveolar defects/Grimm W.D., Arnold W.A., Sirak S.W., Vukovich M.A., Videra D., Giesenhagen B.//Journal of Clinical Periodontology. 2015. Т. 42. № S17. С. 366b-366.
21. Grimm W.D. Translational research: palatal-derived ecto-mesenchymal stem cells from human palate: a new hope for alveolar bone and cranio-facial bone reconstruction/Grimm W.D., Dannan A., Giesenhagen B., Schau I., Varga G., Vukovic M.A., Sirak S.V.//International Journal of Stem Cells. 2014. Т. 7. № 1. С. 23-29.
22. Mikhalchenko D.V. Influence of transcranial electrostimulation on the osseointegration of dental implant in the experiment /Mikhalchenko D.V., Poroshin A.V., Mikhalchenko V.F., Firsova I.V., Sirak S.V.//Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2014. Т. 5. № 5. С. 705-711.
23. Sirak S.V. Microbiocenosis of oral cavity in patients with dental implants and overdentures/Sirak S.V., Avanesyan R.A., Akkalaev A.B., Demurova M.K., Dyagtyar E.A., Sirak A.G.//Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2014. Т. 5. № 5. С. 698-704.
24. Sirak S.V. Social composition and motivation of patients in applying for implant dental service/Sirak S.V., Avanesyan R.A., Sirak A.G., Shchetinin E.V., Demurova M.K.//Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2014. Т. 5. № 5. С. 691-697.
25. Sirak S.V. Prevention of complications in patients suffering from pathological mandibular fractures due to bisphosphonate-associated osteonecroses/Sirak S.V., Shchetinin E.V.//Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2015. Т. 6. № 5. С. 1678-1684.
26. Sirak S.W. Low-level laser irradiation (810 nm) with toluidinblue photosensitizer promotes proliferation and differentiation of human oral fibroblasts evaluated in vitro/Sirak S.W., Entschladen F., Shchetinin E.W., Grimm W.D.//Journal of Clinical Periodontology. 2015. Т. 42. № S17. С. 328a-328.
27. Shchetinin E.V. Pathogenetic aspects of dental pulp pathology / Shchetinin E.V., Sirak S.V., Khodzhayan A.B., Dilekova O.V., Sirak A.G., Vafiadi M.Yu., Parazyan L.A., Arutyunov A.V.// Медицинский вестник Северного Кавказа. 2015. Т. 10. № 2 (38). С. 187-191.
28. Firsova I.V. Clinical and experimental study of the regenerative features of oral mucosa under autohemotherapy/Firsova I.V., Makedonova Iu.A., Mikhalchenko D.V., Poroiskii S.V., Sirak S.V.//Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2015. Т. 6. № 6. С. 1711-1716.